IV SIMPÓSIO ABC
ARGENTINA-BRASIL-CUBA
Sistemas de Produção e Sustentabilidade Agrícola:
Experiências na Argentina, Brasil e Cuba
Realização
Apoio

RESPOSTA DO GENE OSNPF7.4 FRENTE A UM PERÍODO DE SUPRESSÃO DE N-NO_3^- DE 72 HORAS EM ARROZ

OsNPF7.4 Response After 72-Hour N-NO_3^- Suppression In Rice

Maria Eduarda Pimentel de MELO[1]; Erika da Costa FERNANDES[2]; Erinaldo Gomes PEREIRA[3]; Manlio Silvestre FERNANDES[4] & Leandro Azevedo SANTOS[5]

[1]Graduanda em Agronomia (UFRRJ). mariaeduardaufrrj@yahoo.com
[2]Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia (UFRRJ)
Doutorando no Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo (UFRRJ).
[4]Professor Emérito (UFRRJ).
Professor Associado do Departamento de Solos (UFRRJ).

Resumo: O objetivo do presente trabalho é a caracterização da resposta deste gene frente a um período de supressão de N-NO_3^- de 72 horas. Foi conduzido um experimento com plantas de arroz da variedade manteiga em solução nutritiva de Hoagland a ½ FI com 5 mM de N-NO_3^-. Aos 30 dias após a germinação as plantas foram submetidas a um período de supressão do nutriente por 72 horas, sendo realizada uma coleta a cada 24 horas. Nos três dias seguintes o fornecimento de nitrogênio foi reestabelecido e foi realizada coleta da bainha para realização da PCR em tempo real e da análise de expressão relativa. Foram avaliados duas isoformas do gene OsNPF7.4. Nos dois splices foi possível observar um decréscimo dos níveis de resposta da expressão do gene no período de supressão e um pico logo após o ressuprimento. Conclui-se que tais respostas representam alta dependência do gene quanto ao íon para sua expressão e a rápida resposta de transcrição dada sua presença.

Palavras-chave: remobilização, nitrogênio, transportador.

Abstract: The objective of the present work is to characterize the response of this gene to a 72-hour N-NO3- suppression period. An experiment was conducted with rice plants of the "manteiga" variety in Hoagland nutrient solution at ½ FI with 5 mM N-NO3-. At 30 days after germination the plants were subjected to a nutrient suppression period for 72 hours, being collected every 24 hours. In the following three days the nitrogen supply was reestablished and the sheath was collected for real time PCR and relative expression analysis. Two isoforms of the OsNPF7.4 gene were evaluated. In both splices it was possible to observe a decrease in the gene expression response levels in the suppression period and a peak soon after the resupply. It is concluded that such responses represent a high ion dependence of the gene for its expression and the fast transcription response given its presence.

Keyword: remobilization, nitrogen, transporter.

Introdução

O arroz (*Oryza Sativa* L.) é um grão de elevado potencial agrícola por todo o mundo, sendo essencial para a alimentação humana. O Brasil se destaca sendo o único país não-asiático entre os 10 maiores produtores do mundo (FAO, 2019). Por ser uma cultura tão importante economicamente, é necessário que seja estudada buscando elevar cada vez mais sua produtividade agrícola. Um dos fatores que afeta diretamente esta produtividade é a

nutrição mineral das plantas, onde se destacam os macro e micronutrientes responsáveis pelo desenvolvimento dos vegetais superiores.

O Nitrogênio (N) é um macronutriente essencial não só para o pleno desenvolvimento e crescimento vegetal, mas a vida como um todo. Tal característica é proveniente da sua participação na constituição de ácidos nucléicos e proteínas, além de sua presença em ciclos como o do Carbono (C) e até mesmo na fotossíntese. Tal nutriente é requerido em grandes quantidades pelas plantas, determinando seu crescimento e desenvolvimento. O N é encontrado na solução do solo em diversas formas, sendo uma delas o nitrato (NO_3^-) (WILLIAMS e MILLER, 2001).

Quando o NO_3^- é absorvido ele é bombeado para dentro da célula via simporte juntamente com 2 prótons, sendo translocado pela membrana plasmática. Após sua absorção pode ser enviado ao vacúolo celular para armazenamento e posterior utilização ou continuar no citoplasma onde será assimilado, passando por duas etapas de redução, o que ocorre de acordo com a necessidade e disponibilidade energética da planta (SOUZA; FERNANDES, 2019). O transporte do íon no sentido de influxo, ou seja, de entrada no vacúolo, é mediado por genes que codificam transportadores altamente específicos. Entretanto tais mecanismos de transporte do NO_3^- no vacúolo são pouco compreendidos, tendo poucos genes caracterizados até o momento.

Sabe-se que um destes genes localizados no vacúolo é o OsNPF7.4, que foi recentemente caracterizado e apontado como regulador antagônico ao OsNPF7.1, atuando como bloqueador na formação ou alongamento das gemas axilares e no controle do número de perfilhos em arroz. Além disso, apresenta papel importante participando na alocação de N das raízes para as folhas, influenciando o crescimento e desenvolvimento de plantas de arroz (HUANG, 2019). Todavia poucas informações foram disponibilizadas quanto a expressão das isoformas desse gene e de suas respostas frente a períodos de supressão e ressuprimento de nitrogênio.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é a caracterização dos níveis de resposta do gene OsNPF7.4 frente a um período de supressão do fornecimento de nitrogênio na forma de nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) de 72 horas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em câmara de crescimento com plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade Manteiga. As sementes de arroz foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% e transferidas para potes com gaze contendo somente água destilada. Seis dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos de 0,7 mL, dispostos em delineamento inteiramente ao acaso, contendo quatro plantas por vaso que receberam solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950) modificada com ½ força iônica, utilizando 5 mM de $N\text{-}NO_3^-$ e o pH da solução ajustado para 5,5. Esta solução foi trocada a cada três dias.

Aos 30 dias após a germinação foi realizada a primeira coleta, caracterizada como tempo zero. Em seguida a solução nutritiva foi substituída por uma solução sem fornecimento de nitrogênio, para caracterizar o período de supressão de N. Esta foi mantida por três dias realizando-se uma coleta por dia, sempre às 9 horas. No terceiro dia a solução nutritiva foi substituída por uma solução reestabelecendo o fornecimento de nitrogênio com 5 mM de $N\text{-}NO_3^-$ e então foram coletadas amostras nos tempos 4, 8, 24 e 72 horas após o início do período de ressuprimento.

Nas coletas as plantas foram separadas em folha, bainha e raiz, pesadas para obtenção da massa fresca. Uma porção de cada parte da planta foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80 ºC para posterior extração do RNA total, que foi realizada de acordo com Gao et al. (2001). Após extração, as amostras foram tratadas com DNAse utilizando o Kit "Amplification Grade DNAse I" da Sigma®. Em seguida foi realizada a construção da fita de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit "High Capacity RNA-to-cDNA Kit" da *Life Technologies*® seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o kit "5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (*Solis Biodyne*) de acordo com as recomendações do fabricante no equipamento "StepOne Plus Real-Time PCR System" (*Applied Biosystems*). Os cálculos de expressão relativa foram feitos de acordo com Livak e Schmittgen (2001) utilizando a ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) como gene de referência, para todos os primers que apresentaram alta eficiência de amplificaçãoe o tratamento do tempo zero como controle, a partir dos valores de CT (*Cicle Thereshold*, ciclo limite) obtidos na reação de PCR em tempo real. A construção dos gráficos foi realizada utilizando o programa Sigmaplot 12.5.

Resultados e Discussão

O estudo das variações alternativas de um gene permitem um enriquecimento a cerca do conhecimento de suas funções. Deste modo, foram encontradas e avaliada a expressão relativa duas isoformas do gene OsNPF7.4, disponíveis na plataforma *Rice Genome Annotation Project* (http://rice.plantbiology.msu.edu/), um banco de dados mundial de arroz.

De acordo com o gráfico referente a primeira isoforma do gene (Figura 1), é possível observar a baixa expressão nas 72 horas de supressão, sendo muito próxima ao controle, o que pode estar supostamente associado ao consumo do nitrato acumulado nos vacúolos. Já no período de ressuprimento houve resposta acentuada nas primeiras horas de aplicação do N, mostrando a alta regulação da transcrição pelo com a presença do próprio substrato. Esse pico decai próximo as 100 horas e vai se elevando gradativamente até o final da observação (72 horas após o ressuprimento), o que pode ser associado a remobilização do N a medida que ele é consumido da solução aplicada.

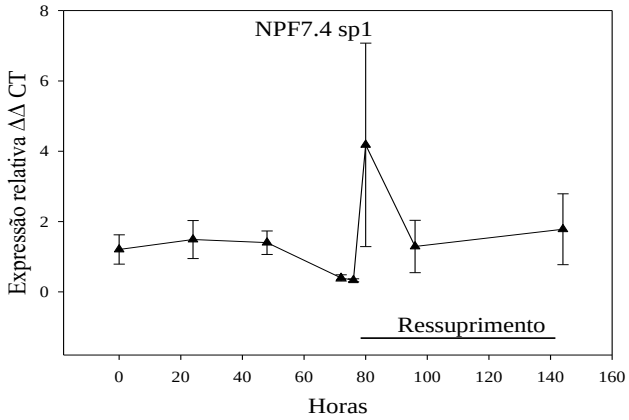


Figura 1. Expressão relativa do gene OsNPF7.4 splice1 em plantas de arroz, da variedade manteiga, submetidas a um período de supressão e ressuprimento de N-NO_3^- de 72 horas.

Por outro lado, na análise da segunda isoforma (Figura 2) houve um pico de expressão do gene 24 horas após a supressão de N, em relação ao tempo 0, podendo indicar a atuação

desta isoforma no efluxo de NO_3^- a partir dos vacúolos, que decai a medida que o estoque do substrato é consumido pela planta. Nas 8 horas após o ressuprimeiro há uma pequena elevação, que possivelmente estaria ligada ao influxo. Entretanto as 72 horas após o ressuprimento foi observado um pico expressivo remetendo novamente a remobilização do N.

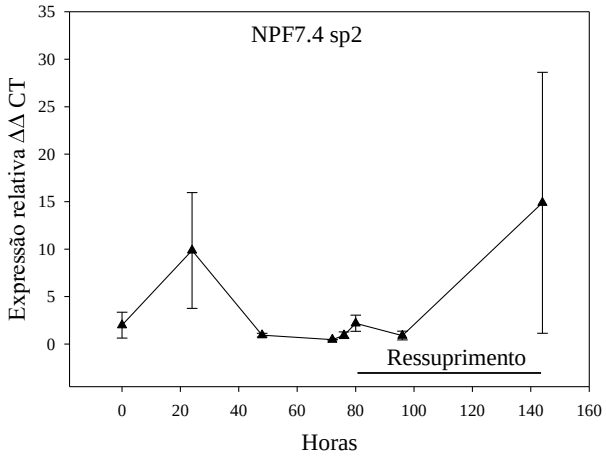


Figura 2. Expressão relativa do gene OsNPF7.4 sp2 frente a um período de supressão e ressuprimento de N-NO3- de 72 horas.

Assim, o presente trabalho apresenta resultados que corroboram com os de Huang (2019), apontando que ambas as variantes deste gene podem possivelmente ser reguladas pela concentração de fontes externas de N. Além de auxiliar numa maior fundamentação do possível funcionamento do gene, apontando em quais momentos sua expressão é mais acentuada quando induzida a fome e ressupressão.

Conclusões

O período de supressão de 72 horas foi suficiente para identificar variações dos níveis de resposta da expressão das duas isoformas do gene OsNPF7.4. A isoforma 1 apresentou maior resposta frente ao ressuprimento de N-NO_3^- na solução, enquanto na isoforma 2 esta resposta foi mais intensa no período de supressão.

Uma alta dependência do gene foi constatada quanto a presença do íon NO_3^- para sua expressão e a rápida resposta de transcrição dada sua presença.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP), ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciências do Solo (PPGA-CS) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela concessão de recursos e da bolsa de estudos para o desenvolvimento do trabalho.

Referências Bibliográficas

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases. Disponível em: http://www.fao.org. Acesso em: 25 set. 2019.

GAO, J. et al. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 185–186, 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v.347, p.1-32, 1950.

HUANG, W. et al. Altered expression of OsNPF7.1 and OsNPF7.4 differentially regulates tillering and grain yield in rice. **Plant Science**, v. 283, p. 23-31, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCт Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

SOUZA, S. R; FERNANDES, M. S.: IX-NITROGÊNIO. In: **Nutrição Mineral de Plantas** - 2ª Edição. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018, p. 309-376.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688,